



HIGHLIGHTS TECNOLOGIE INNOVATIVE

a cura di Pierfausto Seneci - Dipartimento di Chimica organica - Università di Milano

L'ultima rubrica, incentrata su prodotti che hanno fruttato il Nobel ai loro scopritori, mi ha convinto ad estrarre dall'archivio una cartelletta di cui voglio trattare da anni, che contiene articoli e *reviews* sulla *RNA interference*, o RNAi, a partire dall'articolo di Fire e Mello (*Nature*, 1998, **391**, 806) che li ha portati ad ottenere, otto anni più tardi, il Nobel per la Medicina. La mia ritrosia nell'affrontare il soggetto era legata alla sua complessità e alla sua apparente poca affinità per un chimico; da buon ricercatore farmaceutico, ho gettato il cuore oltre l'ostacolo e vi intratterò brevemente sull'argomento.

L'uso di strutture nucleotidiche per influenzare l'espressione di geni implicati in uno o più processi patologici è noto da tempo. Sin dagli anni Ottanta si parla di *oligonucleotidi antisense*, cioè sequenze *single-strand* (mono-filo mi suona male...) disegnate per una perfetta ibridizzazione con una sequenza di mRNA nel nucleo così da degradarla attraverso l'azione della RNasi-H; si parla anche di *terapia genica*, in cui geni interi vengono introdotti, rimossi o modificati in un organismo vivente. Questi sono meccanismi di interferenza nell'espressione genica; ad oggi però si intende come RNAi il risultato dell'osservazione - apparentemente illogica - per cui veicolando in un organismo delle sequenze *double-strand*, o DS, di oligonucleotidi corrispondenti a parte di un gene si ottiene, invece della prevista amplificazione del prodotto genico, un suo "silenzamento" più o meno marcato. Queste osservazioni non hanno portato il Nobel ai primi che le fecero su specie vegetali nei primi anni Novanta, ma a chi anni dopo ne comprese la rilevanza lavorando su altre specie animali: chissà che rimpianti...

Per *small interference RNA*, o *siRNA*, si intendono sequenze esogene di 21meri oligonucleotidici DS, che possono essere introdotte come tali in un organismo oppure come sequenze più lunghe, poi degradate dall'organismo stesso a dare i siRNA; esse sono composte da una *strand* antisense-guida, che, dopo riconoscimento e *processing* da parte di varie proteine, si lega ad uno *RNA-induced silencing complex*, o RISC, dove viene in contatto con la sequenza complementare di un gene che poi renderà "silenziato" e da una *strand* senso-passeggero, che serve a stabilizzare l'oligonucleotide DS e a renderlo biodisponibile - seppur con tempi di emivita ridottissimi.

I *microRNA*, o *miRNA*, sono invece sequenze DS, endogene in specie animali, vegetali e virus, che fanno parte di sequenze molto più lunghe e controllano almeno il 30% dei geni umani; opportuni enzimi le trasformano a dare gli miRNA, che reprimono l'espressione di un gene bersaglio bloccandone fisicamente la traslazione (legame della *strand* antisense-guida all'mRNA, o RNA messaggero), o attraverso destabilizzazione dell'mRNA e successiva degradazione. Moltissimo resta da scoprire per entrambi; piuttosto che proseguire nell'illustrare impropriamente un settore importantissimo, vi indico alcune recenti *reviews*, che vi aiuteranno a soddisfare ogni

vostro dubbio al riguardo. In ordine cronologico: D. Castanotto, J.J. Rossi, *Nature*, 2009, **457**, 426; C.D. Malone, G.J. Hannon, *Cell*, 2009, **136**, 642; P.B. Hajeri, S.K. Singh, *Drug Discov. Today*, 2009, **14**, 851; J. Kurreck, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, **48**, 1378.

Vorrei invece giustificare l'interesse di un chimico per i siRNA. *In primis*, questi oligo DS accettano, e addirittura richiedono, l'introduzione di modifiche chimiche per renderli più selettivi per la sequenza nucleotidica del gene bersaglio, più long lasting nei sistemi cellulari, od organismi viventi e meno metabolicamente attaccabili da endonucleasi ed affini. Al proposito vedi S. Shukla *et al.*, *Chem MedChem*, 2010, **5**, 328 e J.W. Gaynor *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 4169: fosforotioati, boranofosfati, locked nucleic acids-LNA, idrossili metilati o sostituiti con fluoro, nucleobasi modificate e via dicendo...

Un grande problema dei nucleotidi in generale, e dei siRNA in particolare, è la biodisponibilità e l'accesso al sito d'azione: meccanismi di veicolazione passiva - liposomi, molecole *carrier* con caratteristiche chimico-fisiche adeguate - o attiva - produzione dei siRNA endogena per inserzione di catene nucleotidiche nel genoma dell'organismo con trasportatori virali. Al proposito, K.A. Whitehead *et al.*, *Nature Rev. Drug Discov.*, 2009, **8**, 129 e P.B. Hajeri, S.K. Singh, *Drug Discov. Today*, 2009, **14**, 859: molti dei metodi e degli approcci usati richiedono un grande input chimico - scelta dei *carriers*, dei legami di connessione, di spaziatori, etc.

Di seguito riporto alcune applicazioni dei siRNA. Rapida identificazione di nuovi bersagli molecolari, fino ad approcci combinatoriali di co-RNAi con librerie di oligo DS: L.S. Lambeth *et al.*, *BMC Molec. Biol.*, 2010, **11**, 77. Agenti terapeutici, con un paragone veramente attraente, anche se non proprio imparziale, con le nostre piccole molecole: A.K. Vaishnav *et al.*, *Silence*, 2010, **1**, 14. Candidati clinici già in sperimentazione umana: M.R. Lares *et al.*, *Trends Biotechnol.*, 2010, **28**, 570. Qualche parola per i miRNA, fonte ed ispirazione di nuovi progetti farmaceutici in quanto regolatori di *pathways* metabolici - quindi bersagli molecolari essi stessi! Se ne parla in oncologia (M.S. Nicoloso *et al.*, *Nature Rev. Cancer*, 2009, **9**, 293 e R. Garzon *et al.*, *Nature Rev. Drug Discov.*, 2010, **9**, 775) e per malattie neurodegenerative (R. Roshan *et al.*, *Drug Discov. Today*, 2009, **14**, 1123).

Finiamo con qualche lavoro che associa siRNA e nanoentità che fungono da veicolanti-stabilizzatori: da nanoparticelle d'oro (D.A. Giljohann *et al.*, *JACS*, 2009, **131**, 2072) a idrogel (M.D. Krebs *et al.*, *JACS*, 2009, **131**, 9204), da minicellule di origine batterica (J.A. MacDiarmid *et al.*, *Nature Biotech.*, 2009, **27**, 643) ai risultati del primo studio clinico con siRNA supportato su nano particelle (M.E. Davis *et al.*, *Nature*, 2010, **464**, 1067).

Buona lettura!